

青霉素酰化酶产生菌的筛选和大肠杆菌 AS 1.76 产酶条件的研究

张启先 王嫩芝 乐华爱 韩文珍 王祯祥

(中国科学院微生物研究所, 北京)

陆 祥 美

(太原制药厂, 太原)

为筛选较优的产青霉素酰化酶的菌种,我们从9个属的232株细菌中选出了19株产青霉素酰化酶的大肠杆菌,其中,AS 1.76和E 110为最好。

还对大肠杆菌 AS 1.76 的产酶条件进行了研究。结果表明,最适的培养基成分是(%):蛋白胨 1, 苯乙酸 0.2, 玉米浆 0.3, 氯化钠 0.5; 在 250 毫升的三角瓶中装 30 毫升培养基时,通气量正合适;培养基的初始 pH 以 7.0 为佳;培养时间 15 小时。在未加玉米浆的培养基中,少量的 Fe^{2+} (5 微克/毫升)对酶形成有刺激作用,过量的 Fe^{2+} (大于 10 微克/毫升)是不利的;在培养基中添加 0.3% 的玉米浆能降低 Fe^{2+} 对酶形成毒害作用。

青霉素酰化酶 (E.C. 3.5.1.11) 是催化作用青霉素酰胺键的酶类。它既可以水解青霉素产生 6-氨基青霉烷酸 (6-APA) 和一个侧链羧酸,又可以催化从 6-APA 和一个侧链羧酸合成新的半合成青霉素的反应。它的研究已有几十年的历史,并有不少文章对其来源、测定、特性、应用等作了详细的阐述^[1,2]。随着固定化技术的发展,最近已在工业规模上用它来水解青霉素生产 6-APA^[3]。我国也曾经有人对大肠杆菌青霉素酰化酶作过研究^[4],但原有菌种酶活力难以满足工业生产的需要。为此,我们在这一方面做了进一步的研究。本文报道青霉素酰化酶产生菌的筛选及其酶形成条件。

材料和方法

(一) 材料

1. 菌种

大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)	168 株
粪产碱杆菌 (<i>Alcaligenes faecalis</i>)	4 株
产气气杆菌 (<i>Aerobacter aerogenes</i>)	2 株
阴沟气杆菌 (<i>A. cloacae</i>)	4 株
节杆菌属 (<i>Arthrobacter sp.</i>)	2 株
微球菌属 (<i>Micrococcus sp.</i>)	2 株
巨大芽孢杆菌 (<i>Bacillus megaterium</i>)	6 株
假单胞菌属 (<i>Pseudomonas sp.</i>)	32 株
褐色球形固氮菌 (<i>Azotobacter chroococcus</i>)	11 株
变形杆菌属 (<i>Proteus sp.</i>)	1 株

共 232 株,除其中 138 株大肠杆菌由本所质体组提供外,其余均由本所保藏组供给。

2. 斜面培养基

未添加葡萄糖的牛肉汁琼脂培养基。

3. 筛选培养基

本文于 1978 年 9 月 1 日收到。

上海市青霉素酰化酶协作组提供改进了的 NIPAB 合成方法和测定方法。

(1) 合成培养基^[1] (%) : KH_2PO_4 1.36, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.2, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.008, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001, NaOH 0.3, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.04, 乳酸 1.0, 苯乙酸 0.1, 用碱调 pH 至 7.2。

(2) 天然培养基^[6] (%) : 酵母膏 1, 蛋白胨 1, 牛肉汁 0.5, NaCl 0.25, 用碱调 pH 至 7.2。

15 磅灭菌 30 分钟, 备用。

4. 发酵培养基 (%) : 蛋白胨 2, 苯乙酸 0.2, 氯化钠 0.5, 用自来水配制, 用碱调 pH 至 7.0, 8 磅灭菌 30 分钟备用。

(二) 方法

1. 培养方法

在 250 毫升的三角瓶中装入上述培养基 30 毫升, 然后接种培养 18—23 小时的斜面种子 (筛选时, 直接接入一环种子)。发酵培养时, 在上述一支斜面上加入 15 毫升无菌水, 制成菌悬液, 然后每瓶接 1 毫升此菌悬液, 28℃, 170 转/分旋转摇床上培养一定时间 (筛选时用 40—48 小时, 发酵培养时用 15 小时) 后, 吸取发酵液 10 毫升于 3500—4000 转/分离心 15—20 分钟, 弃去上清液, 再加入 3 毫升 pH 7.7, 0.05 克分子的磷酸缓冲液, 制成菌悬液, 留待测酶活。发酵培养时, 直接取发酵液测酶活。

2. 青霉素酰化酶活性测定

NIPAB 法定量测定^[7]: 在 1 毫升浓度为 6 毫克分子的 6-硝基-3-苯乙酰胺苯甲酸溶液 (6-nitro-3-phenylacetamido benzoic acid, 缩写 NIPAB, 用 pH 7.7, 0.05 克分子的磷酸缓冲液配制) 中加入 1.8 毫升同样的缓冲液, 于 40℃ 的恒温水浴上保温, 待温度恒定后, 加入酶液 0.2 毫升。于同一温度下反应 10 分钟, 取出后立即加 2 毫升 0.5 克分子的碳酸钠以中止反应, 4000 转/分离心 20 分钟, 小心倾去上清液, 于 72 型 (或 721 型) 分光光度计, 420 毫微米 (或 405 毫微米), 1 厘米 (或 0.5 厘米) 比色杯比色, 测定光密度值。按下式计算酶活力。

$$\text{酶活力(单位/毫升)} = \frac{\text{OD} \times K}{t \times V_{\text{酶}}}$$

K——光密度值变化 1.0 时, 6-硝基-3-氨基苯甲酸的微克分子数。在我们的测定条件下, OD_{420} 时, $K = 1.014$, OD_{405} 时, $K = 0.625$ 。

t——反应时间(分), 这里是 10 分钟。

$V_{\text{酶}}$ ——测定时酶液的用量(毫升)。

在上述条件下每分钟产生 1 微克分子 6-硝基-3-氨基苯甲酸的酶量定义为 1 个酶活力单位。

3. 细胞浓度测定

取培养液 1 毫升, 加 9 毫升蒸馏水, 均匀悬浮后, 于 721 型分光光度计, 波长 600 毫微米, 0.5 厘米比色杯测定, 用蒸馏水调零点, 以光密度 600 毫微米表示细胞浓度。

结 果

(一) 青霉素酰化酶产生菌的筛选

据报道^[1,2] 青霉素酰化酶按其底物特异性, 目前主要分为三种类型, 即青霉素 V

表 1 青霉素 G 酰化酶产生菌的筛选

微生物名称	株数	产酰化酶株数	酶活力 (单位/毫升)	
			1*	2*
大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)	168	19	0.030— 0.068,	0.015— 0.047
假单胞菌 (<i>Pseudomonas</i>)	32	0	—	—
粪产碱杆菌 (<i>Alcaligenes faecalis</i>)	4	0	—	—
产气杆菌 (<i>Aerobacter sp.</i>)	6	0	—	—
节杆菌属 (<i>Arthrobacter sp.</i>)	2	0	—	—
微球菌 (<i>Micrococcus sp.</i>)	2	0	—	—
巨大芽孢杆菌 (<i>Bacillus megaterium</i>)	6	0	—	—
变形杆菌属 (<i>Proteus sp.</i>)	1	0	—	—
褐色球形固氮菌 (<i>Azotobacter chroococcus</i>)	11	0	—	—
总 计	232	19	—	—

* 指前面筛选培养基中的合成培养基和天然培养基。

酰化酶(I-型)、青霉素G酰化酶(II型)、氨基青霉素酰化酶(III型)。I型主要来源于真菌中,II型和III型酰化酶则主要来源于细菌。我们研究的主要目的是想用酶裂解青霉素G来生产6-APA,即筛选青霉素G酰化酶。因此,我们筛选菌种的重点放在细菌上。筛选的结果列于表1。

从表1的结果看出,我们所筛选的9个属,232株细菌中,产青霉素酰化酶的菌株几乎全部集中于大肠杆菌中,而且在两种培养基上结果基本类同。

表2 产青霉素酰化酶的大肠杆菌的复筛

菌号	合成培养基上的酶活力(单位/毫升,培养40小时)	牛肉汁培养基上的酶活力(单位/毫升,培养48小时)
AS 1.76	0.098	0.070
AS 1.96	0.063	0.052
AS 1.129	—	0.043
AS 1.353	0.072	0.036
AS 1.349	0.068	0.039
AS 1.590	—	0.030
大3	0.067	0.036
大31	0.068	0.060
E 33	0.077	0.047
E 38	0.063	0.031
E 42	0.066	0.037
E 73	0.020	0.050
E 100	0.076	0.044
E 104	0.066	0.043
E 110	0.095	0.054
E 116	0.029	0.010
E 136	0.082	0.036
E 148	0.037	0.029
B 10	0.040	0.024

表2列举了初筛选出的19株大肠杆菌的复筛结果。从表中看出,除AS 1.129和AS 1.590两株菌是营养缺陷型外,其余各株在两种培养基上的产酶趋势大致相同。其中以AS 1.76和E 110为最优菌株。在本研究中选用AS 1.76进行条件试验。

(二) 各种营养条件和发酵条件对青霉素酰化酶形成的影响

1. 蛋白胨的种类和浓度的影响

在筛选中我们曾采用含蛋白胨的培养基。试验过程中发现,蛋白胨种类不同,酶活力有差异。为此,我们选用了六种不同种类的蛋白胨进行比较试验,结果见表3。

由表3可见,蛋白胨I和II最好,其中以蛋白胨I为佳。用全血胰胨几乎不产生青霉素酰化酶。

表3 各种蛋白胨对酶形成的影响*

蛋白胨种类	酶活力(单位/毫升)	细胞浓度(光密度 ₆₀₀ 毫微米)
蛋白胨I	0.330	0.385
蛋白胨II	0.312	0.370
鱼粉胨	0.234	0.390
全血胰胨	0.033	0.260
蛋胨	0.225	0.400
聚胨	0.250	0.400

* 蛋白胨的浓度均为2%。

在此基础上我们又选择蛋白胨I做不同浓度的试验。结果见图1。图1表明,在培养基中添加1%的蛋白胨,酶活力最高,单位重量菌体的酶活力亦高。量过少,菌生长不好,酶活力也低,但蛋白胨量超过1%时,虽然菌体仍在增加,酶活力却有明显下降的趋势。

2. 苯乙酸的影响

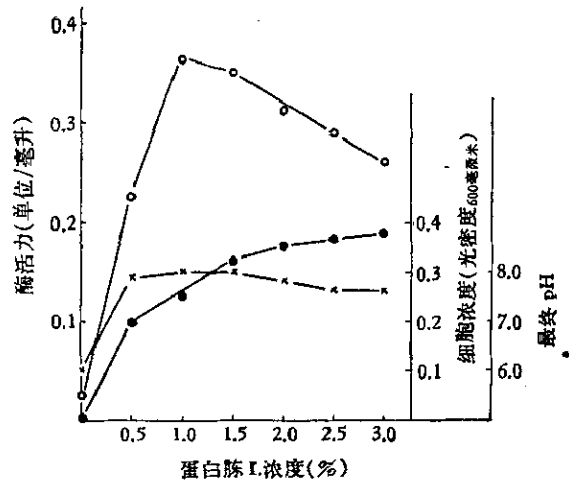


图1 蛋白胨浓度对酶形成的影响

○—○ 酶活力; ●—● 细胞浓度; ×—× 最终 pH

一般认为,^[8,9] 苯乙酸既可作为碳源, 又是青霉素酰化酶形成的诱导剂。为找出酶产生的最适苯乙酸浓度, 我们在含 1% 蛋白胨 I, 0.5% 氯化钠的培养基中添加不同量的苯乙酸进行试验。结果表明(图 2), 不加苯乙酸, 几乎没有酶活力, 随着苯乙酸量的增加, 酶活力也增高, 当苯乙酸的量达 0.25% 时, 酶活力最高。过高的苯乙酸对酶的产生和菌的生长都不利。

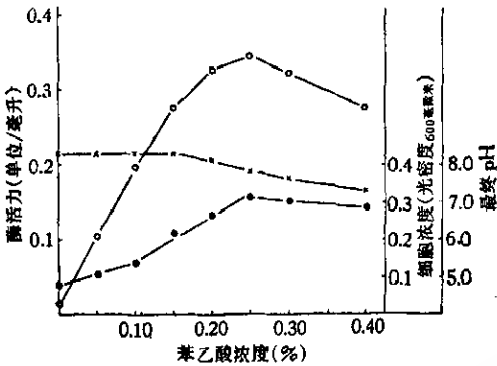


图 2 苯乙酸对酶形成的影响

○—○ 酶活力; ●—● 细胞浓度;
×—× 最终 pH

3. 玉米浆浓度的影响

在 1% 蛋白胨 I, 0.2% 苯乙酸和 0.5% 氯化钠的培养基中添加不同量的玉米浆进行试验。结果表明(图 3), 添加 0.3% 的玉米浆, 不但单位重量菌体的酶活力略有

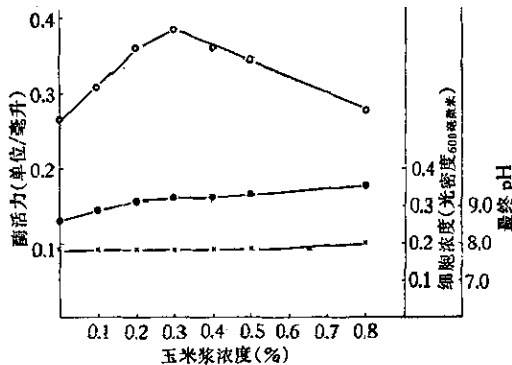


图 3 玉米浆对酶形成的影响

○—○ 酶活力; ●—● 细胞浓度;
×—× 最终 pH

增加, 而且, 菌体的量还稍有增多。过多的玉米浆, 只有利于菌的生长, 却不利于酶的形成。因此是不适宜的。

4. 氯化钠的影响

在含 1% 蛋白胨 I, 0.2% 的苯乙酸的培养基中添加不同量的氯化钠, 实验结果表明(图 4), 氯化钠虽然对菌的生长没有影响, 而对酶活力却有较明显的影响。其中以 0.5% 为最好, 过高或过低对酶的形成都不利。

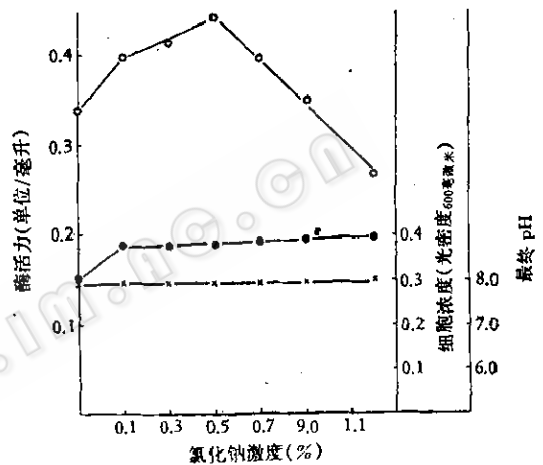


图 4 氯化钠对酶形成的影响

○—○ 酶活力; ●—● 细胞浓度;
×—× 最终 pH

5. Fe^{2+} 对酶形成的影响

据某些研究者报告^[4], 在非玉米浆培养基中, 如果铁离子含量超过 30 微克/毫升, 对大肠杆菌的生长就有抑制作用, 并认为添加玉米浆能消除这种抑制作用。对此, 我们分别在添加 0.3% 玉米浆和没有添加玉米浆的培养基(1% 蛋白胨 I, 0.2% 苯乙酸, 0.5% 氯化钠)上做不同浓度的 Fe^{2+} 试验。从图 5 的结果中看出, Fe^{2+} 对酶的形成确有显著的影响。在未添加玉米浆的培养基中, 5 微克/毫升的 Fe^{2+} 对菌的生长和酶的形成有刺激作用, Fe^{2+} 浓度超过 10 微克/毫升时, 对酶的形成是极其不利的,

而对菌的生长却没有多大影响。在有 0.3% 玉米浆存在的情况下,不利影响可大大减少。可见,添加玉米浆可降低 Fe^{2+} 对酶形成的毒害作用。

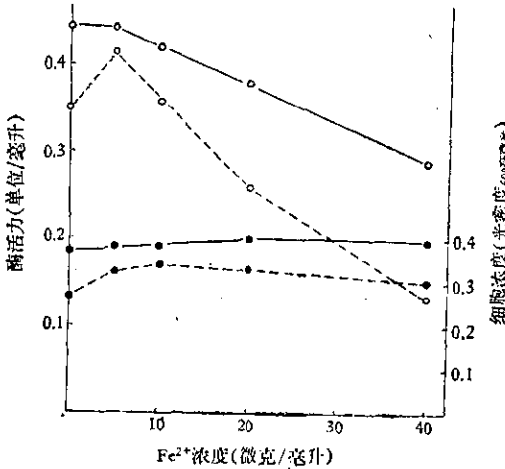


图5 在不同培养基中 Fe^{2+} 浓度对酶形成的影响

○—○ 酶活力; ●—● 细胞浓度
—— 有0.3%玉米浆; --- 未加玉米浆

6. 初始 pH 的影响

将含有 1% 蛋白胨 I, 0.2% 苯乙酸, 0.5% 氯化钠的培养基的 pH 用碱调至不同值,进行培养。实验结果(图 6)表明,最

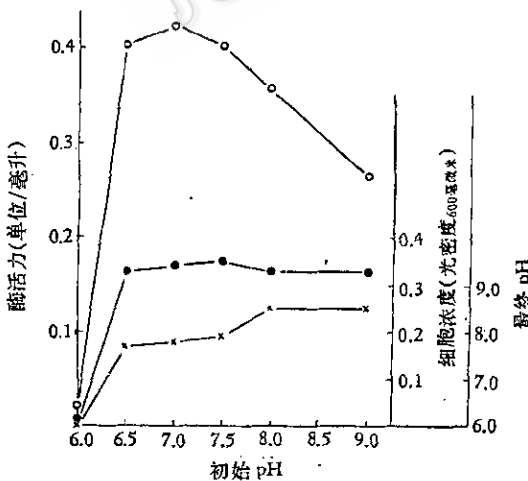


图6 初始 pH 对酶形成的影响

○—○ 酶活力; ●—● 细胞浓度;
×—× 最终 pH

适 pH 的范围是 6.5—7.5, 其中, pH 7.0 时, 酶活力最高。低于 6.5 时, 菌几乎不长, 高于 7.5, 对菌的生长和酶的产生均有不利影响。

7. 通气量的影响

在 250 毫升的三角瓶中, 分别装入 10、20 直至 100 毫升含有 1% 蛋白胨 I, 0.3% 玉米浆, 0.2% 苯乙酸, 0.5% 氯化钠的培养基, 瓶口封有八层纱布。170 转/分的摇床培养, 结果如图 7。图中表明, 装液量 20—

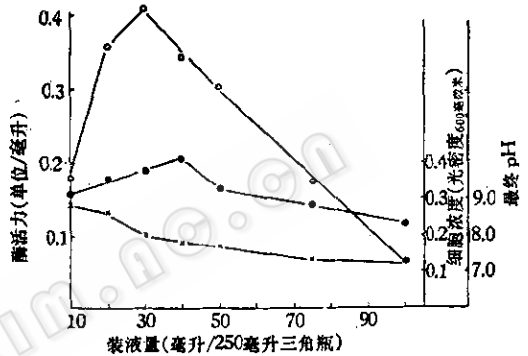


图7 通气量对酶形成的影响

○—○ 酶活力; ●—● 细胞浓度;
×—× 最终 pH

40 毫升时, 酶活力较高, 其中以装 30 毫升液量为最佳。通气量过大或过小对菌生长和酶形成都不利。

8. 培养时间的影响

培养基组成同上, 结果如图 8。实验表明, 酶形成的最大速率是在菌生长的对数期, 一般在 6—12 小时之间。对数期结束, 酶活力达到最高峰, 此时, 培养液的 pH 一般在 7.7—7.8, 此后, 菌生长进入稳定期, 酶活力也基本稳定, 若发酵时间过长, pH 有明显升高的趋势, 酶活力也略有下降。因此, 培养时间不宜过长, 一般以 15 小时左右为宜。

讨 论

青霉素酰化酶是一种诱导酶, 苯乙酸

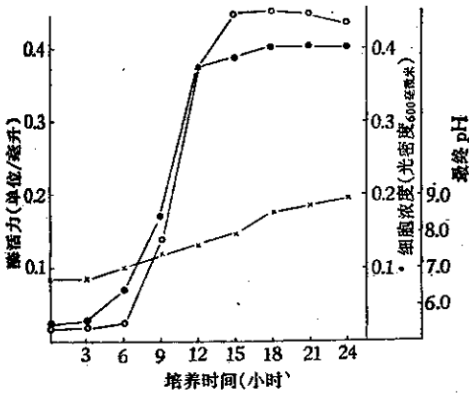


图 8 培养时间和酶形成的关系

○—○ 酶活力； ●—● 细胞浓度；
×—× 最终 pH

及其衍生物是酶形成的诱导剂^[8,9]。我们的实验证明，当苯乙酸的浓度在 0.1% 以下时，它主要起诱导作用，此时，酶活力的递增速率远远超过菌体的增长速率。苯乙酸的浓度过高对酶的形成是不利的。这一点和 Szentirmai 等的结果是一致的。

在我们所用的无玉米浆培养基的条件下，Fe²⁺ 对酶的产生表现出较明显的影响，低浓度时（5 微克/毫升）对酶形成有刺激

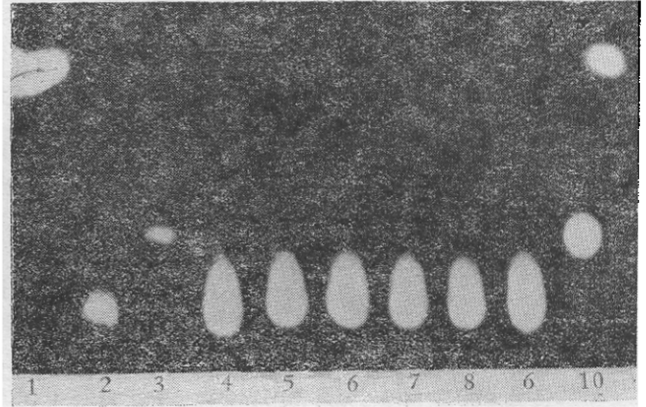


图 9 青霉素 G 酶解液薄板层析*
(以细胞作酶源)

1.青霉素 G-钾溶液 2.标准 6-APA 3.青霉素噻唑啉酸 4、5、6 分别是 AS 1.76 在所试验的三种培养基上所产酶的青霉素裂解液 7、8、9 分别是 E 110 在所试验的三种培养基上所产酶的青霉素裂解液 10.未加酶的对照青霉素溶液，(37℃，保温 2 小时)

作用，高于此浓度时，对酶形成极其不利。但是，Fe²⁺ 的存在对大肠杆菌的生长不但无害，而且是有好处的。它只表现出对酶形成的影响，这一点和某些研究者^[4]的结论不完全一致。

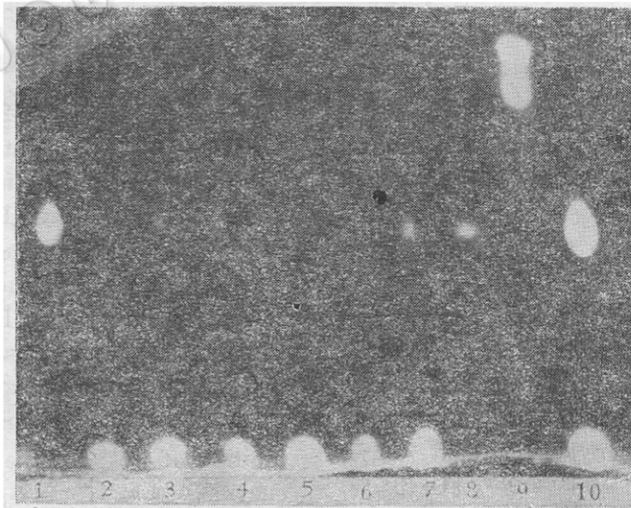


图 10 青霉素-G 酶解液的薄板层析*(以离去细胞的培养液作酶源)
1、10. 未加酶液的对照青霉素溶液； 2—9. 同图 9

* 在 5 毫升培养液离心所得的菌体中，加入 5 毫升 1% 的青霉素 G-钾溶液（用 pH 7.7, 0.05 M 的磷酸缓冲液配制），摇匀，37℃ 保温 2 小时，离心，用上清液点薄层。
展开剂：醋酸丁酯：正丁醇：冰醋酸：水 = 80:15:40:24。

我们筛选出的大肠杆菌 AS 1.76 和 E 110 产生的青霉素酰化酶只包含于细胞中, 在除去细胞的培养液中测不出酶活力 (见图 9、图 10)。因此, 是胞内酶。另外, 无论在细胞中和除去细胞的培养液中均测不到 β -内酰胺酶活力 (见图 9、图 10), 因此, 酶系比较理想, 在以后的实际应用中, 比较有利。

参 考 文 献

- [1] Hamilton-Miller, J. M. T.: *Bacteriol. Rev.*, **30**: 761—771, 1966
- [2] Vandamme, E. J. and J. P. Voets: *Advances in Applied Microbiology*, **17**: 311—369, 1974.
- [3] 千畑一郎: 发酵 & 工业, **35**(4): 281—293, 1977.
- [4] 童村、徐尚志等: 全国第三次抗菌素学术会议论文集(童村、张为申主编), 第二册, 科学出版社, 第 316—319 页, 1965.
- [5] Vojtisek, V. and J. Slezak: *Folia Microbiol.*, **20**: 224—230, 1975.
- [6] Nara, T. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, **35**: 1676—1682, 1971.
- [7] Kutzbach, C. and E. Rauenbusch: *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **355**: 45—53, 1975.
- [8] Szentirmai, A.: *Appl. Microbiol.*, **12**(3): 185—187, 1964.
- [9] Vojtsk, V. and J. Slezak: *Folia Microbiol.*, **20**(4): 289—297, 1975.

THE SCREENING OF PENICILLIN ACYLASE-PRODUCING STRAINS AND THE CONDITIONS FOR ENZYME PRODUCTION BY *ESCHERICHIA COLI* AS 1.76

Zhang Qi-xian Wang Mei-zhi Yue Hua-an

Han Wen-zhen Wang Zhen-xiang

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing*)

Lu Xiang-mei

(*Taiyuan Pharmaceutical Factory, Taiyuan*)

From 232 bacterial strains including nine genera, we selected out 19 penicillin acylase-producing strains (all of which belong to *E. coli*). Among them, AS 1.76 and E 110 are the most promising ones.

Conditions for the production of penicillin acylase by *E. coli* AS 1.76 have been investigated. The medium, most suitable for fermentation, consists of peptone 1%, phenylacetic acid 0.2%, corn-steep liquor 0.3% and NaCl 0.5%. Optimal conditions for enzyme produc-

tion were as follows: 250 ml shake flask filled with 30 ml medium, initial pH 7.0; temperature, 28°C; incubation period, 15 hr. Keeping low Fe^{2+} concentration (5 $\mu g/ml$) may promote formation of penicillin acylase in the medium without corn-steep liquor, but Fe^{2+} concentration beyond 10 $\mu g/ml$ was unadvisable for production of this enzyme. A 0.3% of corn-steep liquor should reduce the inhibition of Fe^{2+} for the production of the enzyme.